

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 773 157

②1 N° d' nregistr m nt national : 97 16673

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 14/47, A 61 K 38/17, G 01 N 33/564



⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 30.12.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 02.07.99 Bulletin 99/26.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : BIO MERIEUX Societe anonyme —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : SERRE GUY BRUNO RENE, GIRBAL  
NEUHAUSER ELISABETH, VINCENT CHRISTIAN,  
SIMON MICHEL, SEBBAG MIREILLE, DALBON  
PASCAL, JOLIVET REYNAUD COLETTE, ARNAUD  
MICHEL et JOLIVET MICHEL.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤4 EPITOPES PEPTIDIQUES RECONNUS PAR DES AUTO-ANTICORPS ANTIFILAGGRINE PRESENTS DANS LE  
SERUM DES PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOIDE.

⑤7 L'invention est relative à des peptides comprenant  
des épitopes reconnus par des autoanticorps antifilagrine  
présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite  
rhumatoïde. Lesdits épitopes comprennent un motif tripep-  
tidique centré sur un résidu citrulline.

L'invention est également relative à des antigènes arti-  
fiels comprenant ces épitopes, et à leur utilisation de cet an-  
tigène pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

FR 2 773 157 - A1



EPITOPES PEPTIDIQUES RECONNUS PAR DES AUTO-ANTICORPS  
ANTIFILAGGRINE PRESENTS DANS LE SERUM DES PATIENTS  
ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOIDE.

La présente Invention est relative à de  
5 nouvelles préparations d'antigènes spécifiquement  
reconnus par des auto-anticorps spécifiques de la  
polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (ci après abrégée  
en " PR ") est le plus fréquent des rhumatismes  
10 inflammatoires chroniques. Il s'agit d'une maladie auto-  
immune, et le sérum des patients atteints contient des  
auto-anticorps dont certains sont spécifiques, et peuvent  
constituer un marqueur de cette maladie, permettant son  
diagnostic même à des stades précoces. Des recherches ont  
15 donc été effectuées en vue d'identifier des antigènes  
reconnus par ces anticorps, afin d'en obtenir des  
préparations purifiées utilisables dans des techniques  
classiques de diagnostic immunologique.

Des auto-anticorps spécifiquement présents  
20 chez les malades atteints de PR et réagissant avec un  
antigène épithélial oesophagien de rat ont été décrits  
pour la première fois par B. J. J. YOUNG et al. dans Br.  
Med. J. 2:97-99, (1979). Ces auto-anticorps ont été à  
l'époque dénommés "anticorps antikératines".

25 Lors de précédents travaux, l'équipe des  
Inventeurs a obtenu, à partir d'épithéliums malpighiens  
humain et murin, des préparations d'antigènes apparentés  
à la filaggrine et à la profilaggrine, reconnus  
spécifiquement par les anticorps présents dans le sérum  
30 de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et  
montré que les " anticorps antikératines " étaient en  
fait des auto-anticorps anti-filaggrine (ci-après  
dénommés " AAF "). La Demande EP 0 511 116 décrit ces  
préparations antigéniques, et leur utilisation pour le  
35 diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

Les filaggrines sont une famille de protéines qui a été identifiée chez diverses espèces, entre autres chez l'homme, le rat, la souris, le cobaye, au niveau des épithéliums malpighiens kératinisants [pour revue sur les  
5 filaggrines, cf. DALE et al. [The Keratinocyte Handbook, Cambridge University Press, pp 323-350, (1994)]. Elles dérivent de la déphosphorylation et de la protéolyse d'un précurseur, la profilaggrine, qui est constituée essentiellement de domaines répétés de filaggrine séparés  
10 par des segments peptidiques interdomaines.

Le gène codant pour la profilaggrine se compose de sous-unités répétées dont chacune code pour une molécule de filaggrine, séparées par des portions codant pour les segments peptidiques interdomaines.  
15 Toutes les unités de répétition codant pour chacune des filaggrines humaines ont la même longueur (972 paires de base chez l'homme) ; cependant, chez l'homme, on observe des variations importantes (10-15%) de séquence d'une sous-unité à l'autre. Si la plupart sont conservatives,  
20 certaines de ces variations induisent des changements d'acides aminés et dans certains cas des changements de la charge électrique de la protéine. Ainsi les filaggrines humaines forment, indépendamment des modifications post-transcriptionnelles, une population  
25 hétérogène de molécules de taille similaire mais de séquences et de charges (pHi égal à  $8,3 \pm 1,1$ ) différentes [GAN et al., Biochem. 29, p. 9432-9440 (1990)].

La profilaggrine est une protéine de poids  
30 moléculaire élevé (environ 400 000 chez l'homme) soluble en présence de fortes concentrations de sels ou d'urée. Elle possède une forte teneur en acides aminés basiques (arginine et histidine), ainsi qu'en glycine, sérine et acide glutamique. Elle est pauvre en acides aminés non  
35 polaires et ne contient ni méthionine, ni cystéine, ni tryptophane. Elle est fortement phosphorylée sur des

résidus sérine, ce qui lui confère un point isoélectrique proche de la neutralité.

La profilaggrine est clivée en unités filaggrine au cours d'un processus complexe de maturation, impliquant une déphosphorylation, suivie d'un clivage par des protéases au niveau des segments interdomaines. Ce clivage génère d'abord des fragments de taille intermédiaire, puis les molécules fonctionnelles de filaggrine.

Les filaggrines issues de la déphosphorylation et du clivage de la profilaggrine sont des protéines basiques dont le contenu en acides aminés est similaire à celui des profilaggrines. Elles participent à l'organisation des filaments de kératine, et subissent une maturation progressive au cours de laquelle les résidus arginine, basiques, sont convertis en résidus citrulline, neutres, sous l'action de la peptidylarginine déiminase [HARDING C.R. et SCOTT I.R., J. Mol. Biol. 170, p. 651-673 (1983)]. Ceci entraîne une réduction de leur affinité pour les kératines dont elles se détachent ; elles sont alors totalement dégradées sous l'action de diverses protéases.

Les propriétés des filaggrines et des profilaggrines ont été particulièrement bien étudiées chez le rat, chez la souris et chez l'homme. La taille de la profilaggrine varie, selon les espèces, de 300 à 400 kD et celle des filaggrines de 27 à 64 kD.

Le polymorphisme observé chez l'homme entre les séquences des unités filaggrine à l'intérieur d'un même gène de profilaggrine n'apparaît pas chez le rat et la souris. Les filaggrines présentent en outre une grande variabilité inter et intra-spécifique au niveau de leur séquence. Cette variabilité n'affecte toutefois pas leurs propriétés fonctionnelles, ni leur composition globale en acides aminés, et leurs propriétés biochimiques. De même, les localisations tissulaires de la profilaggrine et des

filaggrines sont identiques chez les différents mammifères étudiés.

En poursuivant leurs travaux, les Inventeurs ont constaté que la profilaggrine présente dans les  
5 granules de kératohyaline de l'épiderme humain n'était contrairement aux filaggrines, pas reconnue par les AAF[SIMON et al. Clin. Exp. Immunol. 100, 90-98 (1995)]. Ils ont alors testé la réactivité des AAF avec de la filaggrine recombinante, et ont constaté que celle-ci non  
10 plus n'était pas reconnue. D'autre part, il avait été précédemment observé que les formes des filaggrines épidermiques humaines principalement reconnues par les AAF étaient les formes acido-neutres décrites par SIMON et al. [J. Clin. Invest., 92, 1387, (1993)] et dans la  
15 demande EP 0 511 116. Le fait que ces formes acido-neutres correspondent à un stade tardif de maturation de la filaggrine, permettait de supposer que tout ou partie des modifications post-traductionnelles intervenant jusqu'à ce stade étaient impliquées dans la formation des  
20 épitopes reconnus par les AAF.

Pour vérifier cette hypothèse, les Inventeurs ont cherché à reproduire *in vitro*, à partir de filaggrine recombinante, ces modifications post-traductionnelles, afin de déterminer lesquelles étaient susceptibles  
25 d'influer sur l'antigénicité de la filaggrine.

Ils ont ainsi constaté qu'en fait, la citrullination de la filaggrine suffisait à générer des épitopes reconnus par les AAF. En effet, ils ont observé, en procédant à la déimination *in vitro* de filaggrine  
30 recombinante que le remplacement d'au moins une partie des arginines par des citrullines permet l'obtention d'un antigène reconnu spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR. Ils ont en outre localisé des régions qui étaient après citrullination,  
35 fortement immunoréactives vis-à-vis des auto-anticorps anti-filaggrine. Il s'agit en particulier de la région

correspondant à la portion C-terminale (acides aminés 144 à 324) et en particulier aux acides aminés 144 à 314, ainsi que de la région correspondant aux acides aminés 76 à 144, et de la région correspondant aux acides aminés 71 à 119 d'une unité de filaggrine humaine. Ces travaux ont abouti à l'obtention d'antigènes artificiels reconnus spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR, et constitués par des polypeptides recombinants ou de synthèse, dérivés de la séquence de la filaggrine, ou de portions de celle-ci, par substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline. Ces antigènes, ainsi que leur utilisation, font l'objet de la Demande FR FR 96 10651, déposée le 30 août 1996 au nom de BIOMERIEUX.

En poursuivant leur travaux, les Inventeurs sont parvenus à sélectionner à partir de la séquence d'une unité filaggrine, des peptides dans lesquels la substitution d'au moins un résidu arginine par un résidu citrulline donnait naissance à des épitopes reconnus spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR.

Les séquences de ces peptides sont identifiées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

On entend par : " unité filaggrine ", un polypeptide dont la séquence est celle du produit de traduction de l'une quelconque des sous-unités codant pour un domaine filaggrine du gène de la profilaggrine humaine ou d'une autre espèce, ou bien est une séquence consensus, séquence théorique obtenue à partir des séquences des domaines filaggrine.

Les Inventeurs ont maintenant identifié des épitopes reconnus par les auto-anticorps anti-filaggrine : ces épitopes comprennent un motif tripeptidique centré sur un résidu citrulline, spécifiquement présent sur les peptides citrullinés

dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, et absent de la séquence SEQ ID NO: 4.

Il s'agit en particulier du motif tripeptidique Ser-Cit-His, dans lequel Cit représente un  
5 résidu citrulline.

La présente Invention a pour objet un peptide constituant un épitope reconnu par des autoanticorps anti-filaggrine présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce  
10 que ledit épitope comprend un motif tripeptidique centré sur un résidu citrulline, spécifiquement présent sur au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit peptide comprend au moins un motif pentapeptidique centré sur un résidu citrulline, présent sur au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

Avantageusement, ledit peptide comprend le  
20 motif tripeptidique Ser-Cit-His, dans lequel Cit représente un résidu citrulline.

A titre d'exemple, on citera des peptides qui comprennent le motif pentapeptidique, X1-Ser-Arg-His-X2 dans lequel X1=Ser ou Gly, et X2=Ser ou Pro, et parmi  
25 ceux-ci, des peptides qui comprennent le motif hexapeptidique X0-X1-Ser-Arg-His-X2, ou le motif heptapeptidique X0-X1-Ser-Arg-His-X2-X3, dans lesquels X1 et X2 sont tels que définis ci-dessus, X0=Asp, et X3=Gly ou Arg.

Les peptides conformes à l'invention permettent la préparation d'antigènes artificiels reconnus spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Ces antigènes artificiels font  
35 également partie de l'objet de la présente invention.

Des antigènes artificiels conformes à l'invention comprennent au moins un épitope peptidique centré sur un résidu citrulline, tel que défini ci-dessus. Ils sont par exemple constitués par des peptides d'au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés, et avantageusement au moins 14 acides aminés. Il peut s'agir de peptides constitués par au moins un fragment d'au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, ou contenant au moins un tel fragment. Ces peptides peuvent comprendre plusieurs épitopes citrullinés spécifiquement reconnus par les AAF, de séquences identiques ou différentes.

Le terme "peptide" tel qu'utilisé dans la présente Demande signifie notamment protéine ou fragment de protéine, oligopeptide, extrait, séparé ou substantiellement isolé ou synthétisé, notamment ceux obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant ; tout peptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un acide aminé de la série D, et vice-versa ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH de la chaîne peptidique est (sont) remplacée(s) par une (des) liaisons NH-CO ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH et avantageusement toutes les liaisons CO-NH est ou sont remplacée(s) par une ou des liaison(s) NH-CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons CO-NH sus-mentionnées, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles constituant un peptide de référence, ces composés étant encore désignés immunorétroïdes, un mimotope, etc.

Des antigènes conformes à l'invention peuvent par exemple être obtenus par action de la PAD (peptidyl arginine déiminase) sur des protéines ou des peptides



naturels, recombinants, ou de synthèse, comportant des résidus arginine, et en particulier comprenant au moins un résidu arginine constituant le centre d'un motif tripeptidique identique à ceux présents dans les séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ; ils peuvent également être obtenus par synthèse peptidique, en incorporant directement un ou plusieurs résidus citrulline, et de préférence, un ou plusieurs épitopes comprenant un résidu citrulline, tels que définis ci-dessus, dans le peptide synthétisé.

La présente Invention a également pour objet l'utilisation des antigènes conformes à l'invention, tels que définis ci-dessus, pour le diagnostic *in vitro* de la PR.

La présente invention englobe en particulier des compositions antigéniques pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lesquelles compositions sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un antigène conforme à l'invention, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

La présente Invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps de classe G spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la PR éventuellement présents ;
- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

Ce procédé de détection peut être mis en oeuvre grâce à un nécessaire comprenant au moins un antigène selon l'Invention, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu

réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

Ledit nécessaire peut également comprendre, le cas échéant, des échantillons de référence, tels qu'un ou plusieurs sérum(s) négatif(s) et un ou plusieurs sérum(s) positif(s).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et de mise en œuvre d'antigènes conformes à l'invention.

**EXEMPLE 1 : DEIMINATION IN VITRO DE FILAGGRINE RECOMBINANTE PAR LA PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE (P.A.D.).**

De la filaggrine recombinante est produite selon le protocole suivant :

Un fragment d'ADN codant pour une unité filaggrine est amplifié par PCR, à partir d'ADN génomique humain (cellules RAJI : ATCC CCL86) à l'aide des 2 amorces suivantes :

Amorce 5' :  
5' TTCCTATACCAGGTGAGCACTCAT 3'

Amorce 3' :  
5' AGACCCTGAACGTCCAGACCGTCCC 3'

Le produit d'amplification est cloné dans le site SmaI du vecteur pUC19. On procède à la sélection des clones recombinants, en vérifiant la présence d'un insert de 972 pb obtenu après digestion avec SacI et XbaI. Cet insert est ensuite sous-cloné dans pUC19. L'insert résultant de ce sous-clonage est ensuite transféré dans le vecteur pGEX (commercialisé par la société PHARMACIA), entre les sites EcoRI et HindIII. Le vecteur d'expression ainsi obtenu exprime, dans *E. coli*, la filaggrine en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST), sous contrôle du promoteur procaryote Tac. La synthèse de la protéine recombinante est induite par addition d'isopropyl- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) à la culture.

La filaggrine recombinante ainsi obtenue sera dénommée ci-après : " fil-gst ".

On constate après électrophorèse, l'existence de 9 fragments qui résultent d'une protéolyse post-traductionnelle de la filaggrine entière.

Le mélange des 9 fragments est soumis à une déimination *in vitro* par la peptidyl arginine déiminase.

On utilise une préparation de peptidyl arginine déiminase de muscle de lapin (681 U/ml) commercialisée par TAKARA BIOMED EUROPE, selon le protocole préconisé par le fabricant.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Milieu réactionnel : Tris-HCl 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,4 ;
- Rapport enzyme/substrat : 140 mU/μmole de filaggrine contenant 10% d'arginine soit 4 mU/μmole d'arginine ;
- Incubation : entre 0 et 60 mn à 50°C ;
- Arrêt de la réaction : chauffage 3 mn en tampon de LAEMMLI

On effectue en parallèle les 8 réactions suivantes.

(1) BSA (sérum albumine bovine) incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.

(2) BSA incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(3) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.

(4) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (5 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(5) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (15 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(6) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (30 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(7) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(8) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D. et en présence de 10 mM de N-éthylmaléimide (inhibiteur de la P.A.D.).

On dépose 1 µl de chaque échantillon sur un gel d'électrophorèse (gel PHAST<sup>®</sup>-SDS 12,5%, PHARMACIA), et on réalise l'électrophorèse avec l'appareil PHAST-SYSTEM<sup>®</sup> (PHARMACIA), dans les conditions préconisées par le fabricant. Après transfert sur nitrocellulose, on révèle soit avec un pool de 5 sérums de patients atteints de PR, dilué au 1/2000 soit avec l'anticorps monoclonal anti-filaggrine AHF2 [SIMON et al. J. Invest. Dermatol. 105, 432, (1995)] à la concentration de 0,2 µg/ml.

Le complexe antigène/anticorps est révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, par la technique ECL.

Les résultats montrent qu'en l'absence de réaction de citrullination, la fil-gst n'est pas reconnue par les sérums de patients atteints de PR, alors que dès 5 minutes de citrullination, elle est détectée par ces sérums. On constate une augmentation de la réactivité avec le pool de sérums quand on fait agir la P.A.D. pendant 60 minutes à 50°C.

En outre, ces résultats permettent de supposer qu'il existe un ou plusieurs épitopes de forte affinité dans la moitié COOH-terminale de la filaggrine (positions 144 à 324), cet ou ces épitope(s) étant répété(s) entre les positions 76 et 144.

**EXEMPLE 2 : CITRULLINATION DES PEPTIDES S-47-S ET S-35-R PAR LA P.A.D, ET ESSAI DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES CITRULLINES.**

Le peptide de 49 acides aminés S-47-S de séquence (code 1 lettre) :

NH<sub>2</sub>-STGHSGSQHSHTTTQGRSDASRGSSGSRSTSRETRDQEQSGDGSRHSGS-COOH

correspondant aux acides aminés 71 à 119 de la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant 6 résidus arginine, et

le peptide de 37 acides aminés S-35-R de séquence (code 1 lettre) :

NH<sub>2</sub>-SQDRDSQAQSEDSERRSASASRNHRGSAQEQRDGSR-COOH

correspondant aux acides aminés 155 à 191 de la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant 7 résidus arginine, ont été préparés par synthèse peptidique. Les peptides S-47-S et S-35-R sont représentés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros respectifs SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO: 4.

Ces 2 peptides, ainsi que la fil-gst, ont été citrullinés par action de la P.A.D., pendant 30 minutes à 50°C, dans le même milieu réactionnel que celui indiqué à l'exemple 1. Les conditions spécifiques pour chaque peptide, et pour la fil-gst sont les suivantes :

- peptide S-47-S : 4 mU/μmole arginine
- peptide S-35-R : 2,7 mU/μmole arginine
- fil-gst : comme indiqué à l'exemple 2.

On compare, par " dot-blot ", la réactivité de chaque peptide et celle de la fil-gst, avant et après action de l'enzyme, vis-à-vis de l'anticorps monoclonal AHF4, et du sérum d'un patient atteint de PR.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- 0,5 μg par dépôt de chaque antigène (peptides, fil-gst, variants acido-neutres de la filaggrine (VAF))
- Traitement de la nitrocellulose 45 minutes à 80°C, avant immunodétection.
- sérum PR utilisé à la dilution de 1/2000 ; anticorps monoclonal AHF4 utilisé à une concentration de 0,2 μg/ml

Les résultats montrent que :

- AHF4 reconnaît le peptide S-47-S et la fil-gst citrullinés ou non, mais ne reconnaît pas S-35-R, citrulliné ou non.

- S-47-S est reconnu, après citrullination, par le sérum du patient atteint de PR, alors que S-35-R, citrulliné ou non, n'est pas reconnu. Le même sérum reconnaît par ailleurs les VAF et la fil-gst citrullinée, mais ne reconnaît pas la fil-gst non-citrullinée.

**EXEMPLE 3 : SYNTHÈSE DES PEPTIDES E-12-H ET E-12-D CITRULLINES ET NON CITRULLINES ET ESSAI DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES.**

Les peptides E-12-H et E-12-D ont été déterminés par référence aux séquences nucléotidiques du gène de la profilaggrine humaine décrites par GAN S.Q et al. [Biochemistry, 29 : 9432-9440, (1990)].

Le peptide de 14 acides aminés E-12-H de séquence (code 1 lettre) :

$\text{NH}_2\text{-EQSADSSRHSGSGH-COOH}$

comprend 1 résidu arginine, et

le peptide de 14 acides aminés E-12-D de séquence (code 1 lettre) :

$\text{NH}_2\text{-ESSRDGSRHPRSHD-COOH}$

comprend 3 résidus arginine.

Les peptides E-12-H et E-12-D sont représentés dans la liste de séquences en annexe sous les numéros respectifs SEQ ID NO: 5 et SEQ ID NO: 6.

Ces peptides ont été préparés par synthèse peptidique en phase solide.

Les peptides E-12-H et E-12-D citrullinés ont été synthétisés directement par incorporation d'une citrulline en remplacement d'une arginine.

Pour le peptide E-12-D, seul le résidu arginine correspondant au 8<sup>ème</sup> acide aminé de la séquence a été remplacé par une citrulline lors de la synthèse peptidique.

La réactivité de chaque peptide citrulliné et non citrulliné a été testée respectivement vis-à-vis d'un sérum normal, de deux sérums de patients PR, d'anticorps anti-filaggrine (AFAs) purifiés à partir d'un pool de 45 sérums de patients PR et d'anticorps anti-filaggrine purifiés à partir de 12 sérums de patients PR.

#### PROTOCOLE EXPERIMENTAL :

Les puits de plaques de microtitration NUNC MAXISORP ont été revêtus respectivement à l'aide des peptides E-12-D et E-12-H non-citrullinés et citrullinés, dilués à une concentration de 5 µg/ml dans un tampon PBS (pH: 7,4) et incubés pendant une nuit à 4°C (volume final : 100 µg/puits). Les puits ont été saturés pendant 30 minutes à 37°C en PBS-Tween 20, 0,05% gélatine 2,5%, 200 µl/puits. Le sérum de contrôle négatif (sérum normal) a été dilué au 1/120. Les anticorps anti-filaggrine ont été dilués en PBS-Tween 20, 0,05%-gélatine 0,5% (PBS TG) de sorte que les concentrations finales en auto-anticorps anti-filaggrine soient celles indiquées dans le tableau I annexé. Le sérum de contrôle négatif, les sérums PR et les anticorps anti-filaggrine ont été ajoutés (volume final : 100 µl/puits) et soumis à incubation pendant 1 heure à 37°C et une nuit à 4°C. Des anticorps de chèvre anti-chaînes lourdes gamma des immunoglobulines humaines, marqués à la peroxydase (commercialisés par la société SOUTHERN BIOTECHNOLOGIES) ont été ajoutés dans chaque puits (dilution en PBSTG : 1/2000, volume final : 100 µl/puits) et soumis à incubation pendant 1 heure à 37°C. La révélation a été effectuée par addition d'orthophénylènediamine (2mg/ml, pendant 10 minutes).

Les résultats présentés dans le tableau I annexé sont donnés en rapport de DO à 492 nm : signal peptide citrulliné/signal peptide non-citrulliné.

Ces résultats montrent que, dans la majorité des cas, le rapport en DO peptide citrulliné/peptide non-citrulliné est supérieur à 1, et illustrent donc la bonne

sensibilité des peptides citrullinés par rapport aux peptides non-citrullinés pour leur réactivité vis-à-vis des autoanticorps anti-filaggrine.



TABLEAU I

Peptide	Sérum de contrôle	Sérum PR1		Sérum PR2			Pool d'AFAs			AFAs purifiés à partir de 12 sérums PR											
		10*	20*	5*	10*	20*	5*	10*	20*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*
E-12-D	1,076	1,42	1,85	2,42	3,77	5,57	1,77	1,63	1,48	1,99	1,38	2,48	1,19	1,12	3,50	1,87	5,19	1,13	1,57	1,11	1,65
E-12-H	1	1,32	1,20	10,44	11,51	8,38	2,45	2,42	1,82	7,16	2,05	1,06	1,18	0,76	13,57	4,14	3,18	1,14	3,66	1,22	5,84

\* : Concentration en AFAs en µg/ml.

## LISTE DE SEQUENCES

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTCCTATACC AGGTGAGCAC TCAT

24

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AGACCCTGAA CGTCCAGACC GTCCC

25

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 49 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (C) NOMBRE DE BRINS:
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Ser Thr Gly His Ser Gly Ser Gln His Ser His Thr Thr Thr Gln Gly  
 1                      5                      10                      15

Arg Ser Asp Ala Ser Arg Gly Ser Ser Gly Ser Arg Ser Thr Ser Arg  
                     20                      25                      30

Glu Thr Arg Asp Gln Glu Gln Ser Gly Asp Gly Ser Arg His Ser Gly  
                     35                      40                      45

Ser

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS:
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

SDOCID: &lt;FR\_\_2773157A1\_I\_&gt;

## REVENDEICATIONS

- 1) Peptide comprenant un épitope reconnu par des autoanticorps anti-filaggrine présents dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce que ledit épitope comprend un motif tripeptidique centré sur un résidu citrulline, spécifiquement présent sur au moins un des peptides citrullinés dérivés des séquences SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.
- 2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend le motif tripeptidique Ser-Cit-His, dans lequel Cit représente un résidu citrulline.
- 3) Antigène artificiel reconnu spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par au moins un peptide selon une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 4) Utilisation d'un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, pour le diagnostic *in vitro* de la polyarthrite rhumatoïde.
- 5) Composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse .
- 6) Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :
- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, dans des conditions permettant la formation d'un

complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde éventuellement présents ;

- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

7) Nécessaire pour la détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un antigène selon quelconque des revendications 1 à 3, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**